

DOI: 10.15825/1995-1191-2015-2-45-50

СРАВНЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ СПОСОБОВ СБОРА КОСТНОГО МОЗГА ОТ ДОНОРОВ, НАХОДЯЩИХСЯ В СОСТОЯНИИ БИОЛОГИЧЕСКОЙ СМЕРТИ

М.Ш. Хубутия, И.Н. Пономарев, Н.В. Боровкова

НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского, Москва, Российская Федерация

Цель: сравнить с учетом количества и качества получаемых гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) эффективность разных способов заготовки костного мозга от доноров, находящихся в состоянии биологической смерти. **Материалы и методы.** Исследование провели на 43 донорах, находившихся в состоянии биологической смерти не более 6 часов. Для сбора биоматериала в каждое крыло подвздошной кости устанавливали по две костные иглы, которые объединяли герметичной системой, подключенной к хирургическому отсосу и волнометрическому насосу. Аспирации КМ проводили, используя разные значения вакуума, а также комбинируя с нагнетанием в кость раствора. В полученных образцах оценивали объем, количество ядросодержащих клеток (ЯК), ГСК и их жизнеспособность. **Результаты.** По сравнению со стандартным режимом применение повышенного до 0,6–0,7 атм разрежения увеличивало эффективность заготовки ЯК на 65,6%, ГСК – на 87% и не отражалось на их жизнеспособности. Использование разрежения 0,9 атм приводило к сбору меньшего количества ГСК и их повреждению. При использовании аспирации-промывания заготавливали на 86,2% больше ГСК, но жизнеспособность клеток была ниже, чем при простой аспирации. Последовательно выполняя простую аспирацию и аспирацию-промывание, из одного КПК заготавливали $407,2 \pm 46,7$ мл биоматериала, $8,0 \pm 0,8 \times 10^9$ ЯК и $194,2 \pm 20,8 \times 10^6$ ГСК. При этом доля жизнеспособных клеток составляла не менее $75,2 \pm 3,2\%$. **Заключение.** Способ забора КМ с разрежением 0,6–0,7 атм последовательно аспирацией и аспирацией-промыванием позволяет заготовить большее количество прогениторных клеток без потери их качества. В результате от одного донора, находящегося в состоянии биологической смерти, можно заготовить прогениторные клетки разных типов в количестве, достаточном для системного применения у взрослого пациента.

Ключевые слова: доноры органов, костный мозг, стволовые клетки.

COMPARISON OF THE EFFECTIVENESS OF METHODS FOR BONE MARROW HARVESTING FROM NON-HEART BEATING DONORS

M.Sh. Hubutija, I.N. Ponomarev, N.V. Borovkova

N.V. Sklifosovsky Clinical and Research Institute for Emergency Medicine, Moscow, Russian Federation

Aim. To compare the effectiveness of different methods for bone marrow (BM) harvesting from non-heart beating donors taking into account the number and the quality of collected hematopoietic stem cells (HSC). **Materials and methods.** The study was performed on 43 non-heart beating donors. For BM harvesting two bone marrow aspiration needles were installed in each iliac bone. The needles were installed in one bone connected to closed system, combined with surgical suction and volumetric pump. BM aspiration was performed using different values for vacuum and combining with perfusion solution into the bone. The volume, the number of nucleated cells (NC), HSC and cell viability were evaluated in the obtained samples. **Results.** Compared with the standard mode the usage of vacuum 0.6–0.7 atm increased the collection of NC by 65.6%, HSC 87%, and did not reduce their viability. Using a vacuum of 0.9 atm reduced the amount of collected HSC and damaged cells. While using combined aspiration and perfusion of BM HSC were prepared at more than 86.2%, but the viability of the cells was lower than under the standard aspiration. Having coherently performed a standard aspiration and aspiration with perfusion from one iliac bone 407.2 ± 46.7 ml BM, $8.0 \pm 0.8 \times 10^9$ NC and $194.2 \pm 20.8 \times 10^6$ HSC were harvested. The proportion of viable cells was not less than $75.2 \pm 3.2\%$. **Conclusion.** Method of

Для корреспонденции: Пономарев Иван Николаевич. Адрес: 129010, г. Москва, Б. Сухаревская пл., д. 3, корп. 9, комн. 410. Тел. (926) 281-12-40. E-mail: rzam@yandex.ru

For correspondence: Ponomarev Ivan Nikolaevich. Address: 3/9, Bolshaya Sukharevskaya ploschad, Moscow, 129010, Russian Federation. Tel. (926) 281-12-40. E-mail: rzam@yandex.ru.

BM harvesting implying coherently performing aspiration and aspiration-perfusion with the usage of vacuum 0.6–0.7 atm allows to prepare more progenitor cells without losing their quality. As a result, from one non-heart beating donor different types of progenitor cells can be collected in the amount sufficient for systemic infusion in adult patient.

Key words: non-heart beating donors, bone marrow, stem cell.

Внимание трансплантологов все больше привлекает вопрос использования клеток костного мозга (КМ) для индукции иммунной толерантности в организме реципиента после пересадки органа [1, 2]. При этом основная часть клинических исследований подразумевает получение органа и прогениторных клеток от живых доноров. В то же время доноры органов, находящиеся в состоянии биологической смерти и являющиеся источником получения полноценного КМ [3], остаются без внимания, хотя констатация гибели человека позволяет заготовить от него максимально возможное количество биоматериала.

Существующие способы заготовки посмертного КМ подразумевают его аспирацию из крыльев подвздошных костей (КПК). При этом в связи с отсутствием у доноров, находящихся в состоянии биологической смерти, давления в кровеносном русле основной силой, обеспечивающей миелоаспирацию, является вакуум в системе для сбора. Стандартная величина разрежения при использовании закрытых систем составляет 0,4 атм (300 мм рт. ст.) [4]. Однако в случае изменения реологических свойств крови и проходимости сосудов, кровоснабжающих область миелоаспирации, эффективность сбора значительно снижается. При частичном выключении кости из кровообращения преодолеть сопротивление миелоаспирации можно, используя большее разрежение. В случае полного прекращения тока крови в кость заготовка КМ будет возможна только при перфузии в губчатое вещество раствора из экстракорпорального источника [5]. Однако в связи с тем что длительное время эффективность миелоаспирации было принято оценивать по количеству полученных ядросодержащих клеток, до сих пор остается неизученным, сколько прогениторных клеток удастся заготовить, применяя тот или иной способ сбора КМ.

Цель исследования: сравнить с учетом количества и качества получаемых гемопоэтических стволовых клеток эффективность разных способов заготовки костного мозга от доноров, находящихся в состоянии биологической смерти.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование провели на 43 донорах, находившихся в состоянии биологической смерти не более 6 ч (ДТ). Заготовку биоматериала проводили в операционной с соблюдением правил асептики и анти-

септики. В начале операции в каждое КПК устанавливали по два троакара – рядом с передней верхней и задней верхней осями. Затем костные иглы объединяли контуром – одноразовой многоканальной закрытой системой, соединенной с накопительной емкостью. Для создания и поддержания разрежения в контуре к емкости подключали хирургический электроотсос. В случае необходимости нагнетания в кость жидкости из экстракорпорального источника его соединяли с системой через волюметрический насос (рис. 1, а). С целью предотвращения образования сгустков КМ накопительный контур обрабатывали 2 мл гепарина 5000 Ме/мл.

Для сравнения результатов применения при миелоаспирации увеличенного разрежения заготовку КМ от донора проводили, параллельно используя разные значения вакуума. В первой серии экспериментов у 12 ДТ аспирацию из одного КПК выполняли при стандартном разрежении 0,4–0,5 атм, а из противоположного – 0,6–0,7 атм. Во второй серии у 6 доноров использовали разрежение 0,6–0,7 и 0,9 атм соответственно. Продолжительность миелоаспираций составляла 30 мин.

Для оценки эффективности простой аспирации и аспирации-промывания сбор КМ выполняли параллельно обоими методами. У 7 ДТ из одной КПК КМ аспирировали через оба троакара (рис. 1, б), а из второй – только по одной из костных игл, одновременно нагнетая в губчатое вещество через незадействованный троакар стерильный изотоничный 0,9% раствор NaCl (рис. 1, в). При этом величина разрежения в накопительных контурах была 0,6–0,7 атм, а скорость перфузии через волюметрический насос составляла 800 мл/ч. Заготовка продолжалась 30 мин.

Для определения целесообразности комбинирования простой аспирации и аспирации-промывания сбор КМ выполняли последовательно обоими методами. У 18 доноров троакары, установленные в оба КПК, объединяли одним накопительным контуром. На 1-м этапе сбор биоматериала проводили методом аспирации при разрежении 0,6–0,7 атм одновременно через все троакары. Продолжительность процедуры составляла 30 минут. Затем накопительную емкость заменяли и приступали ко 2-му этапу – аспирации-промыванию КМ. Для этого в каналах герметичной системы, идущих от одного из троакаров каждой кости к накопительной емкости, создавали разрежение 0,6–0,7 атм. Одновременно с

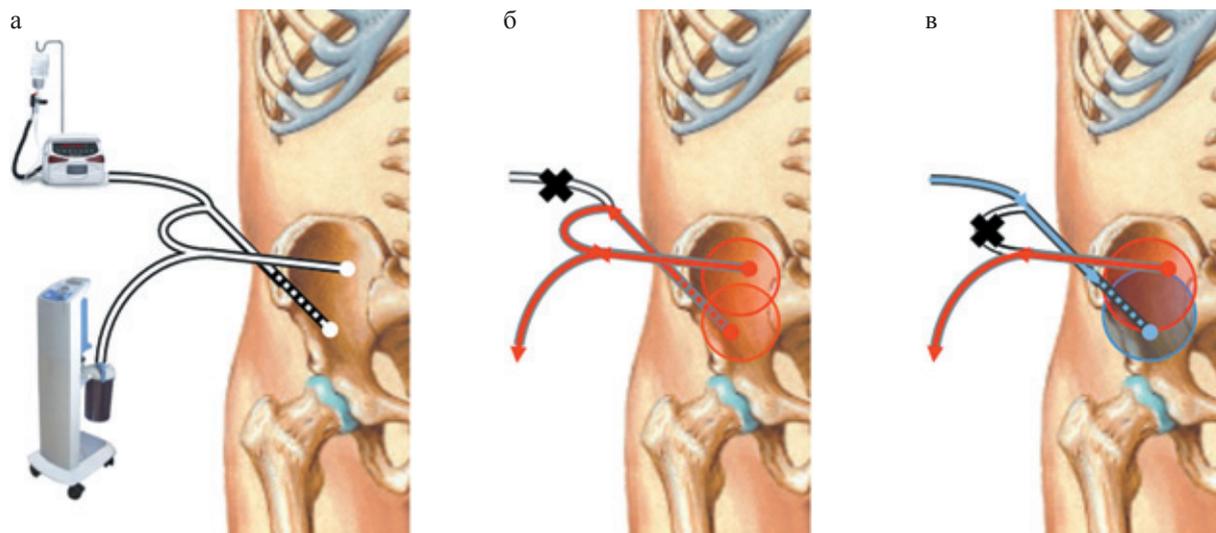


Рис. 1. Схемы: а – установка одноразовой многоканальной закрытой системы, соединенной с хирургическим электроотсосом и волнометрическим насосом; б – направление тока миелоасpirата при простой аспирации; в – направление тока миелоасpirата и рабочего раствора при аспирации-промывании

этим по каналам от волнометрического насоса в обе кости нагнетали раствор 0,9% NaCl со скоростью 800 мл/ч.

Объем образцов вычисляли, вычитая из величины веса полной накопительной емкости массу пустой тары. Разницу в граммах принимали за объем в миллилитрах.

Подсчет концентрации ядросодержащих клеток в образцах проводили на гематологическом анализаторе COULTER Ac-T diff 2 (Beckman-Coulter). Определение абсолютного количества (кл/мкл) и доли (%) клеток с фенотипом $CD45^{low}CD34^{+}$ (гемопоэтические стволовые клетки, ГСК) выполняли на проточном цитометре FC500 (Beckman-Coulter). Долю нежизнеспособных клеток (%) также оценивали методом проточной цитометрии, используя ДНК-специфический краситель 7-амино-актиномицина D (7-AAD), проникающий через клеточную мембрану при нарушении ее целостности.

Для статистической обработки результатов рассчитывали средние величины, среднеквадратичное отклонение (σ). Все выборки проверялись на нормальность распределения с помощью теста Колмогорова–Смирнова. Для сравнения переменных с нормальным распределением пользовались парным t-критерием Стьюдента (для независимых выборок).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В первой серии экспериментов, используя увеличенное до 0,6–0,7 атм разрежение, всегда заготавливали больше биоматериала, чем применяя стандартный режим 0,4–0,5 атм (рис. 2, а). При этом концентрации ядросодержащих клеток между аспиратами, полученными от одного донора при раз-

ных значениях вакуума, значительно не отличались (рис. 2, б). В итоге общее количество ядросодержащих клеток в биоматериале, собранном с использованием режима 0,6–0,7 атм, всегда было достоверно больше, чем в заготовленном при применении стандартного разрежения (рис. 2, в). Аналогичным образом миелоасpirаты, полученные параллельно при разных значениях вакуума, различались по показателям содержания ГСК (рис. 2, г, д). При этом доли поврежденных клеток в образцах, собранных при стандартном и повышенном до 0,6–0,7 атм разрежении, были сопоставимы (рис. 2, е).

Во второй серии экспериментов объем образцов, полученных с использованием режима 0,6–0,7 атм, также превосходил результат применения увеличенного до 0,9 атм разрежения (рис. 3, а). Стоит отметить, что у 2 доноров на стороне, где для сбора использовали режим 0,9 атм, к 10-й мин миелоасpirации наблюдали остановку поступления биоматериала в накопительную емкость. В то же время из противоположной КПК аспирация, проводившаяся с применением разрежения 0,6–0,7 атм, продолжалась вплоть до окончания эксперимента. При этом биоматериал, полученный с применением режима 0,9 атм, всегда имел достоверно большую концентрацию ядросодержащих клеток (рис. 3, б), но был менее насыщен $CD45^{low}CD34^{+}$ -клетками (рис. 3, г). В результате общее количество заготавливаемых ГСК при использовании разрежения 0,9 атм уступало результатам миелоасpirации в режиме 0,6–0,7 атм (рис. 3, в, д). Небольшой объем образцов, заготовленных в режиме 0,9 атм, и меньшая концентрация ГСК в них, вероятно, являются признаками ограничения кровотока через кость, причинами которого могли быть эмболизация или спадание со-

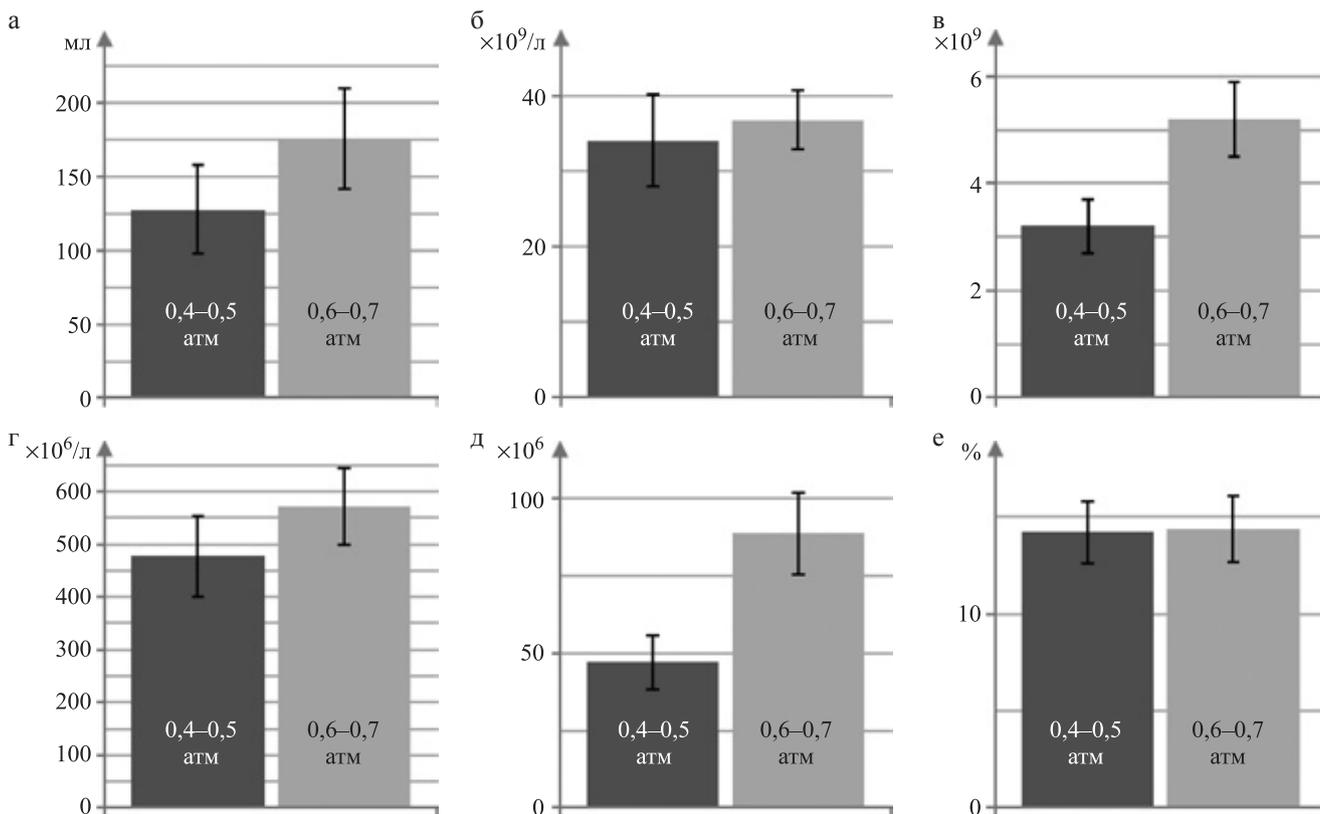


Рис. 2. Соотношение показателей объема (а), концентрации (б) и общего количества (в) ядросодержащих клеток, концентрации (г) и общего количества (д) ГСК, доли нежизнеспособных клеток (е) между образцами, полученными при использовании разрежения 0,4-0,5 и 0,6-0,7 атм (n = 12)

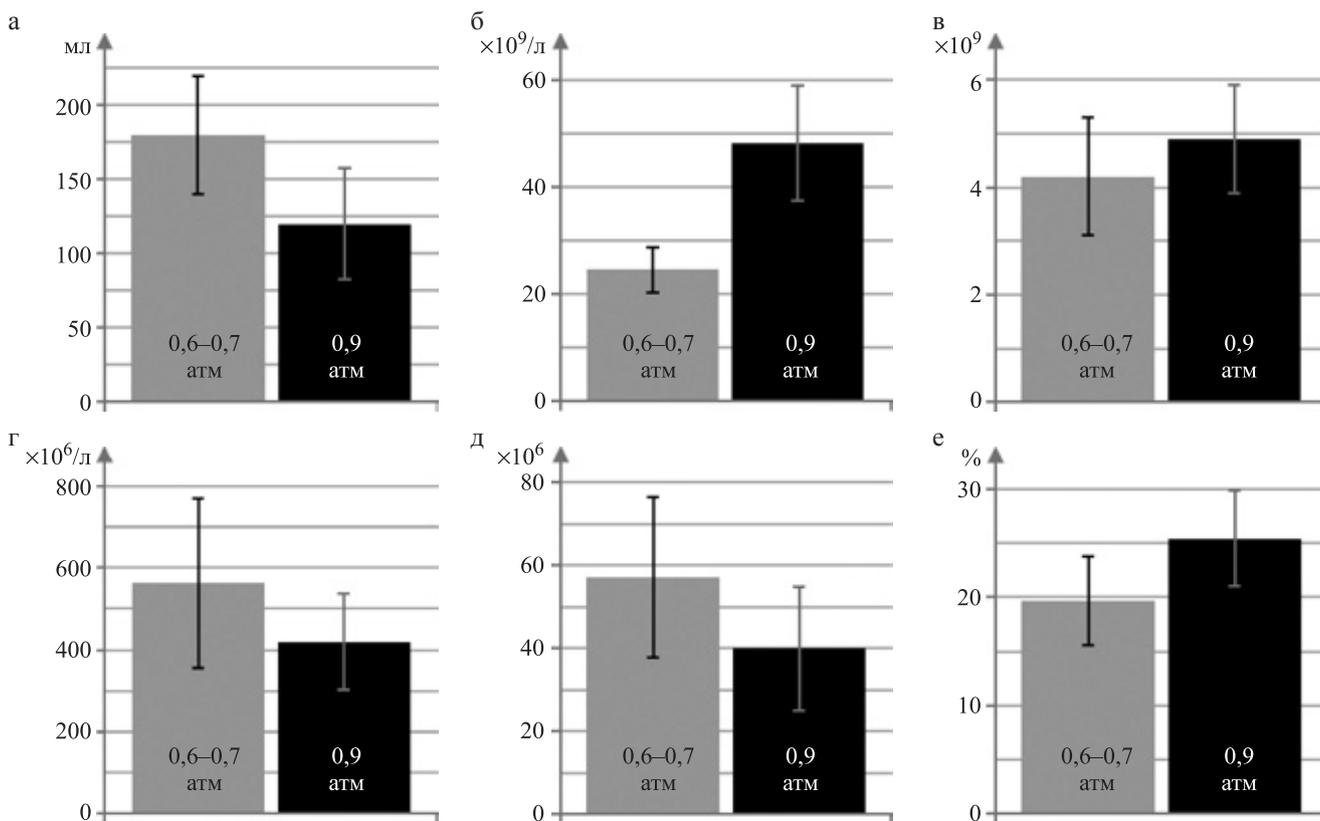


Рис. 3. Соотношение показателей объема (а), концентрации (б) и общего количества (в) ядросодержащих клеток, концентрации (г) и общего количества (д) ГСК, доли нежизнеспособных клеток (е) между образцами, полученными при использовании разрежения 0,6-0,7 и 0,9 атм (n = 6)

судов из-за воздействия чрезмерного разрежения. При этом важно отметить, что в биоматериале, собранном при разрежении 0,9 атм, количество поврежденных клеток было значительно больше, чем в полученном с применением режима 0,6–0,7 атм (рис. 3, е).

Таким образом, для сбора КМ методом аспирации предпочтительнее использовать разрежение 0,6–0,7 атм. Его применение по сравнению со стандартным режимом на 65,6% увеличивало эффективность сбора ядродержащих клеток и позволяло заготавливать на 87% больше ГСК. При этом не вызывало их дополнительного повреждения.

При параллельном проведении забора КМ от одного донора методами простой аспирации и аспирации-промывания достоверно больший объем биоматериала получали в случае нагнетания в кость раствора из экстракорпорального источника. Однако концентрация ядродержащих клеток в «промывном» КМ была достоверно меньше, чем в образцах, собранных за счет аутологичной крови. В результате общее количество ядродержащих клеток значительно не различалось между образцами, полученными простой аспирацией и аспирацией-промыванием. Иную ситуацию отмечали при сравнении образцов по показателям количества ГСК. Концентрация прогениторных клеток в «промывном» биоматериале несколько превышала аналогичный показатель образцов, полученных простой аспирацией, но разница недостоверна. В итоге заготовка аспирацией-промыванием большего объема более насыщенного ГСК КМ выразилась в получении достоверно большего количества клеток предшественников, чем при аспирации. Однако при использовании рабочего раствора получаемый биоматериал содержал достоверно больше незрелых клеток, чем собираемый за счет аутологичной крови (табл.).

Таким образом, используя аспирацию-промывание, заготавливали биоматериал с достоверно большим (на 86,2%) количеством ГСК, но с меньшей долей жизнеспособных клеток, чем простой аспирацией.

Полученные при аспирации-промывании результаты могут свидетельствовать как о более эффективном вымывании прогениторных клеток из губчатого вещества, так и о недостатке протективных свойств у изотоничного 0,9% раствора NaCl, используемого при этом.

Дополнительно стоит отметить, что при простой аспирации наибольшую скорость накопления материала отмечали в начале операции, за первые 10 мин заготавливая в среднем до 50% от окончательного объема. Затем поступление миелоаспирата в накопительную емкость постепенно становилось менее интенсивным и в большинстве случаев прекращалось к 25–30-й мин. Кардинально иную динамику наблюдали при аспирации-промывании КМ. В начале сбора интенсивность накопления миелоаспирата была наименьшей. Однако уже через 5–7 мин она значительно увеличивалась и сохранялась на высоком уровне до окончания операции.

При последовательном применении простой аспирации и аспирации-промывания на первом этапе в среднем заготавливали $194,4 \pm 24$ мл биоматериала с концентрацией ядродержащих клеток $31 \pm 2,8 \times 10^9$ /л, ГСК – $431,3 \pm 45,4 \times 10^6$ /л. На втором этапе дополнительно получали $212,8 \pm 25,9$ мл «промывного» КМ, содержащего ядерные клетки в концентрации $11,2 \pm 0,8 \times 10^9$ /л, ГСК – $585,9 \pm 73,1 \times 10^6$ /л.

В результате простой аспирацией заготавливали $5,6 \pm 0,8 \times 10^9$ ядродержащих клеток, из которых $81,0 \pm 12,1 \times 10^6$ являлись ГСК. При этом доля неповрежденных клеток составляла $82,3 \pm 1,9\%$. Аспирацией-промыванием дополнительно собирали $2,4 \pm 0,48 \times 10^9$ ядродержащих клеток, включавших $113 \pm 15,3 \times 10^6$ ГСК, из которых $75,2 \pm 3,2\%$ были жизнеспособными. В сумме из одного КПК заготавливали $407,2 \pm 46,7$ мл биоматериала, $8,0 \pm 0,8 \times 10^9$ ядродержащих клеток и $194,2 \pm 20,8 \times 10^6$ ГСК. При этом доля жизнеспособных клеток составляла не менее $75,2 \pm 3,2\%$. Это количество сопоставимо с дозой прогениторных клеток, применяемой при системном введении у взрослых пациентов гематологического профиля.

Таблица

Сравнительная характеристика образцов КМ, полученных параллельно разными методами из разных КПК одного донора

Показатели	Аспирация $X \pm \sigma$ (n = 7)	Аспирация-промывание $X \pm \sigma$ (n = 7)
Объем, мл	$220,7 \pm 42,9$	$370 \pm 55^*$
Концентрация ядродержащих клеток, $\times 10^9$ /л	$25,1 \pm 3,9$	$13,6 \pm 2^*$
Общее количество ядродержащих клеток, $\times 10^9$	$4,9 \pm 0,7$	$5,0 \pm 1,0$
Концентрация ГСК, $\times 10^6$ /л	$383,7 \pm 64,5$	$441,6 \pm 60,9$
Общее количество ГСК, $\times 10^6$	$83,7 \pm 20,9$	$155,9 \pm 27,0^*$
Доля неповрежденных клеток, %	$13,8 \pm 1,4$	$27,8 \pm 1,9^*$

Примечание. * – различия достоверны между группами при $p < 0,05$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время отсутствуют унифицированные протоколы применения клеток КМ для формирования у реципиента иммунной толерантности к трансплантированному органу. Это обусловлено в том числе отсутствием четких ответов на вопросы о кратности введения и количестве клеток, необходимом для достижения стойкого клинического результата («терапевтическая доза»). Учитывая, что для достижения требуемого эффекта предпочтительнее использовать прогениторные клетки, аутологичные пересаженному органу [6], для исследователей очень важно иметь возможность сформировать значительный их пул из КМ донора органов.

На основании полученных данных мы считаем, что при заготовке КМ от доноров, находящихся в состоянии биологической смерти, предпочтительнее использовать повышенное до 0,6–0,7 атм разрежение. Его применение по сравнению со стандартным режимом на 65,6% увеличивает эффективность сбора ядросодержащих клеток, позволяет заготовить на 87% больше ГСК и не вызывает дополнительного повреждения прогениторных клеток. При этом разрежение 0,9 атм противопоказано использовать для миелоаспирации, так как оно приводит к сбору меньшего количества прогениторных клеток и снижает их качество. Выполняя сбор КМ комбинированием аспирации и аспирации-промыывания, можно компенсировать присущие методам недостатки и увеличить количество собираемых прогениторных клеток. Начиная сбор КМ методом аспирации, удается заготовить значительное количество ядросодержащих клеток и сформировать в накопительной емкости пул аутологичной крови. Продолжение заготовки биоматериала аспирацией-промыыванием позволяет дополнительно собирать значимые количества ядросодержащих клеток и ГСК.

Исходя из того, что в КМ человека, как правило, концентрации ММСК и ГСК имеют корреляционную зависимость, можно предположить, что от одного донора, находящегося в состоянии биологической смерти, возможно одномоментно заготовить прогениторные клетки разных типов в количестве, достаточном для формирования «терапевтической дозы» для взрослого пациента [7].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. van Bekkum DW. Experimental basis of hematopoietic stem cell transplantation for treatment of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol.* 2002; 72 (4): 609–620. Review. PubMed PMID: 12377928.
2. Nakao A, Toyokawa H, Kimizuka K, Nalesnik MA, Nozaki I, Bailey RJ et al. Simultaneous bone marrow and intestine transplantation promotes marrow-derived hematopoietic stem cell engraftment and chimerism. *Blood.* 2006; 108 (4): 1413–1420. DOI:10.1182/blood-2006-02-004341.
3. Michalova J, Savvulidi F, Sevc L, Forgacova K, Necas E. Cadaveric bone marrow as potential source of hematopoietic stem cells for transplantation. *Chimerism.* 2011; 2 (3): 86–87. PubMed PMID: 22163067; PubMed CentralPMCID: PMC3234361.
4. Инструкция Министерства здравоохранения СССР по заготовке и консервированию посмертного костного мозга. М., 1989. *Instruktsiya Ministerstva zdravookhraneniya SSSR po zagotovke i konservirovaniyu posmertnogo kostnogo mozga.* М., 1989.
5. Медведев ПМ, Раков АА, Пафомов ГА. Методы получения максимально возможного количества костного мозга и крови от трупов. *Метод. рекомендации.* Л.: НИИ гематологии и переливания крови, 1982: 25. *Medvedev PM, Rakov AA, Pafomov GA. Metody polucheniya maksimal'no vozmozhnogo kolichestva kostnogo mozga i krovi ot trupov. Metod. rekomendatsii.* Л.: НИ гематологии и переливания крови, 1982: 25.
6. Онищенко НА, Артамонов СД, Крашенинников МЕ, Башкина ЛВ, Никольская АО, Шагидулин МЮ и др. Клетки костного мозга донора как регулятор индукции иммунной толерантности в организме реципиента при аллогенной пересадке органов. *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* 2009; XI (4): 97–102. *Onishchenko NA, Artamonov SD, Krashennnikov ME, Bashkina LV, Nikol'skaya AO, Shagidulin MY i dr. Donor's bone marrow cells as regulator of immune tolerance induction in recipient's of allogenic organs. Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov = Russian journal of transplantology and artificial organs.* 2009; XI (4): 97–102. [English abstract].
7. Reinders ME, de Fijter JW, Roelofs H, Bajema IM, de Vries DK, Schaapherder AF et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of allograft rejection after renal transplantation: results of a phase I study. *Stem Cells Transl Med.* 2013; 2 (2): 107–111. DOI: 10.5966/sctm.2012-0114. PubMed PMID: 23349326; PubMed Central PMCID: PMC3659754.

Статья поступила в редакцию 20.02.2015 г.